小峰熊蜂蜂毒磷脂酶 A2 基因的克隆及表达分析

高丽娇，黄家兴*，吴 杰*
（中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室，北京 100093）

摘要：磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)是蜂毒主要成分，也是蜂毒的主要过敏原，在熊蜂个体和群体防御方面具有重要功能。为了探究熊蜂 A2 基因的生物学功能，本研究以小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 为材料进行了蜂毒 PLA2 基因的克隆、鉴定与表达特性分析。结果表明：该基因全长为 2 272 bp，GenBank 登录号为 KF214771，由 4 个外显子和 3 个内含子组成，编码区(CDS)长为 543 bp，共编码 180 个氨基酸残基。氨基酸序列相似性分析显示，成熟的小峰熊蜂 PLA2(含有 136 个氨基酸)与其他蜂类 PLA2 的氨基酸序列相似性较高，均包含 10 个保守的半胱氨酸残基、1 个保守的 Ca^{2+} 结合位点和 1 个酶活性中心。基于 PLA2 氨基酸序列的系统进化树分析表明，熊蜂属 *Bombus* 与蜜蜂属 *Apis* 在不同分支上，属单系群，且蜜蜂属分化较早。荧光定量 PCR 结果表明，PLA2 基因在小峰熊蜂各日龄均有表达，且随日龄增长，表达量呈先上升后下降的趋势，10 日龄时出现峰值，其表达量显著高于其他日龄($P<0.05$)。半定量 PCR 结果表明，PLA2 基因在毒腺、卵巢、中肠中表达量较高，在足、触角、食道腺中表达量较低，在脂肪体、肌肉、神经、气管、复眼、脑中未表达。本研究探明了小峰熊蜂 PLA2 的基因结构及其表达特性，丰富了熊蜂 PLA2 的生物学基础，为进一步深入研究熊蜂 PLA2 生物学功能和作用机制以及开发蜂毒生物制剂等鉴定了基础。

关键词：小峰熊蜂；磷脂酶；基因克隆；序列分析；基因表达
中图分类号：966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)09-0974-08

Cloning and expression analysis of a gene encoding phospholipase A2 from the venom of *Bombus hypocrita* (Hymenoptera: Apidae)

GAO Li-Jiao, HUANG Jia-Xing*, WU Jie* (Key Laboratory for Insect-Pollinator Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Phospholipase A2 (PLA2) is the major component of bee venom as well as the main allergen of venom, and plays a key role in the individual and colony defense of bumblebee. A PLA2 gene from *Bombus hypocrita* was cloned, identified and expressed in this study in order to clear its characteristics and function. The results indicated that the full-length cDNA of *B. hypocrita* PLA2 gene is 2 272 bp in length, consisting of 4 extrons and 3 introns. The coding region, 543 bp in length, encodes a 180-amino-acid protein. Comparative analysis revealed that the mature PLA2 (consisting of 136 amino acids) possesses features consistent with PLA2s from other bees, including ten conserved cysteine residues, a highly conserved Ca^{2+}-binding site and one active site. Phylogenetic tree of PLA2 sequences showed that *Bombus* PLA2 clustered into a branch independent with *Apis* PLA2 which differentiated earlier. The real-time PCR analysis showed that *B. hypocrita* PLA2 was expressed in different day-old adults, and the expression level increased first and then decreased, with the maximum expression level in the 10 day-old adults. The PLA2 gene were highly expressed in the venom gland, ovary and midgut, less expressed in legs, antennae and esophageal glands, and not expressed in fat body, muscles, nerve, tracheae, compound eyes and brain. This study revealed the characteristics and expression of PLA2 gene in *B. hypocrita*, which is useful not only for further studies on the function and mechanism of *Bombus* PLA2, but also for the development of new reagent of bee venom.

Key words: *Bombus hypocrita*; phospholipase (PLA); gene cloning; sequence analysis; gene expression

---

基金项目：国家自然科学基金项目(31072092)；国家蜂产业技术体系建设专项(CARS-45)；公益性行业(农业)科研专项课题(201203080-4)
作者简介：高丽娇，女，1985 年生，河北石家庄人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂生物学，E-mail：gaolijiao002004@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: huangjiaxing@caas.cn; apis@vip.sina.com
收稿日期 Received：2013-06-26；接受日期 Accepted：2013-08-07

蜂毒(bee venom)是由工蜂或蜂王毒腺和副腺分泌的具有芳香气味的一种淡黄色透明液体，贮存在毒囊中，属于天然毒素的一种。工蜂的毒液主要用于防御其他动物对其自身或巢穴的侵犯，蜂王的毒液主要在与其他蜂王争斗中使用(Xin *et al*., 2009)。蜂毒中包含大量多肽和蛋白(Gauldie *et al*., 1976; Banks *et al*., 1979; Argiolas and Pisano, 1985; Kreil, 1995; Six and Dennis, 2000; Buku and Price, 2001; Favreau *et al*., 2006)，具有抗炎(Yoon *et al*., 2008)、抗癌(Son *et al*., 2007)、抗菌(Ribeiro *et al*., 2004)、抗辐射、杀虫(Ross *et al*., 1987)等药理或生物学活性。

磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)是蜂毒的主要成分之一，约占蜂毒干重的 12%，按其来源和生化性质区分，其属于胞外分泌的 PLA2 碱性糖蛋白，含量仅次于溶血肽，是蜂毒的主要过敏原(Habermann, 1972; Hoffman and Jacobson, 1996)。PLA2 是一种水解天然磷脂的催化酶，可水解磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂丝氨酸等的第 2 位脂酰基，这种水解作用会破坏膜的稳定性(Six and Dennis, 2000)。PLA2 具有较强的溶血活性，与溶血肽起协同作用，被称为“间接的溶血毒素”(Dudler *et al*., 1992; Kelley *et al*., 1992)。

到目前为止，科学家已经报道了多种蜜蜂 PLA2 的晶体结构、生化特性及基因特征等研究结果。Neumann 和 Habermann(1954)首次发现意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 蜂毒中的 PLA2，Scott 等(1990)应用 X 衍射方法研究意大利蜜蜂 PLA2 的晶体结构，确定了 PLA2 的二硫键位置、Ca^{2+} 结合位点和酶活性中心。Hoffman 等(2001)从地熊蜂 *Bombus terrestris* 的蜂毒中分离出 PLA2，氨基酸序列分析表明其与蜜蜂 PLA2 的一致性仅 52.9%。Xin 等(2009)通过对红光熊蜂 *Bombus ignitus* 毒腺进行表达序列标签分析，克隆了 PLA2 的 cDNA 序列，并用其处理昆虫 Sf9 细胞，结果表明 PLA2 结合于细胞膜上，可水解细胞膜上的磷脂并诱导细胞凋亡。目前对蜂毒 PLA2 的作用机制及功能尚未明确，而利用分子生物学技术方法进行研究有助于阐明蜂类 PLA2 基因作用机制，在熊蜂上，已对地熊蜂 *B. terrestris*、红光熊蜂 *B. ignitus* 和 *Bombus pennsylvanicus* 的 PLA2 进行了相关研究(Hoffman and Jacobson, 1996; Hoffman *et al*., 2001; Xin *et al*., 2009)，但是其所提供基础信息还较有限。小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 是我国优良传粉蜂种之一，分布广泛(安建东等, 2008, 2010; An *et al*., 2011)，易于规模化人工繁殖(安建东等, 2010)，传粉性能优良(陈文峰等, 2011; 董捷等, 2011; 赵亚周等, 2011)，在生态环境保护和农业授粉中具有重要的利用价值。目前，有关小峰熊蜂 PLA2 基因的研究还未见报道。本研究以小峰熊蜂为材料，利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)克隆 PLA2 的 cDNA，并利用染色体步移技术获得 PLA2 基因的全长；采用实时荧光定量 PCR 和半定量 PCR 技术分析 PLA2 在不同日龄及不同组织的表达水平，以期为进一步研究 PLA2 生物学功能及应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

小峰熊蜂为本实验室人工饲养；pMD19-T 载体(大连宝生物工程公司)；琼脂糖凝胶回收试剂盒(中科瑞泰)；反转录试剂盒、Taq 聚合酶、荧光定量 PCR 试剂盒和大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)。

1.2 蜂毒毒腺总 RNA 提取和 cDNA 合成

取单头活体小峰熊蜂工蜂，剖出毒腺，采用 Trizol 法提取总 RNA(按照说明操作)。利用 cDNA 合成试剂盒，将蜂毒总 RNA 反转录成第一链 cDNA。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库红光熊蜂的 PLA2 序列，设计第 1 对 5′RACE (R1)和 3′RACE (F1)反应引物，分别用于基因的 5′端和 3′端扩增；设计第 2 对引物用于半定量 PCR (F2, R2)；根据荧光定量引物设计原则，设计第 3 对引物用于 qRT-PCR (F3, R3)；内参基因为 *β-actin*，引物为：β-actin F, β-actin R；上述引物在北京博迈德科技发展有限公司合成(表 1)。

1.4 PLA2 全长扩增

根据 GenBank 数据库红光熊蜂的 PLA2 序列，设计引物(F1, R1)，利用所设计的正向引物 F1 和 polyA 尾巴、反向引物 R1 与 5′端的加尾结构特异性引物以小峰熊蜂毒腺 cDNA 为模板进行降落 PCR，将 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接，转化 Trans-T1 大肠杆菌细胞，选取阳性克隆条带的菌液送北京华大基因进行测序。将测序结果采用 BioEdit V7.0.9.0 软件拼接序列，获得 PLA2 基因序列的 cDNA 全长。

表 1　本研究所用引物
Table 1　Primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequences (5′-3′)
F1	CGGGATCCTACAGAGACGCCTATCCAT
R1	CCGCTCGAGTATCGAACTCGTACTCCTTG
F2	TGGAGTTGTGCGTTTTCA
R2	CTTCGGGGCAGTTGTATC
F3	CAGTGATATGGTAGAAGT
R3	AATTAGTTAGTCCGTGTT
β-actin F	CTTCCCATCTATCGTCGG
β-actin R	GGTTGCCATTTCCTGTTC

从小峰熊蜂组织中提取基因组 DNA，利用染色体步移试剂盒与 PLA2 基因特异性引物(F2，R2，F3 和 R3)，PCR 产物克隆测序，利用 Bioedit V7.0.9.0 软件拼接序列，获得 PLA2 基因全长。

1.5　序列分析与分子进化树构建

从 NCBI 网站下载下列物种的 PLA2：小峰熊蜂 *B. hypocrita*，GenBank 登录号 AEO51763；红光熊蜂 *Bombus ignitus*，FJ768907；地熊蜂 *Bombus terrestris*，P82971；*B. pennsylvanicus*，Q7M4I6；西方蜜蜂 *Apis mellifera*，NP_001011614；东方蜜蜂 *Apis cerana*，A59055；大蜜蜂 *Apis dorsata*，Q7M415；丽蝇金小蜂 *Nasonia vitripennis*，XP_001604598 PLA2 氨基酸序列，利用 ClustalW 软件进行 PLA2 氨基酸多序列比对，利用 MEGA 5.05 软件最大似然法构建系统发育树。采用 SignalP 4.1 软件对小峰熊蜂 PLA2 氨基酸序列进行信号肽预测。

1.6　PLA2 基因在熊蜂各组织的表达分析

用 Trizol 试剂分别提取小峰熊蜂足、触角、食道腺、卵巢、脂肪体、肌肉、神经、气管、复眼、脑、中肠、毒腺的总 RNA，反转录成 cDNA。以 *β-actin* 基因为内参，采用半定量 PCR 方法检测 PLA2 基因在不同组织器官中的表达情况。PCR 扩增条件为：94℃变性 30 s，56℃退火 20 s，72℃延伸 1 min，反应循环数为 28，最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7　PLA2 基因在不同日龄工蜂中表达

采用 qRT-PCR 的方法检测 PLA2 基因在小峰熊蜂工蜂 6 个不同龄期毒腺中的相对表达量。用 Trizol 法分别提取小峰熊蜂工蜂 0，5，10，15，20 和 25 d 毒腺(每日龄取 3 头工蜂的毒腺，混合后提取总 RNA)的总 RNA(Li *et al*., 2010)，反转录成 cDNA。采用内参 *β-actin* 引物和 PLA2 基因片段引物(F3，R3)进行 qRT-PCR，每样品重复 3 次，反应条件为：95℃预变性 30 s，接着进行 40 个循环：95℃ 5 s，60℃ 34 s，通过 Mx3000P 软件分析结果。

1.8　数据统计与分析

采用比较 C_T 值法的相对定量法(Livak and Schmittgen, 2001)，分析 PLA2 基因在小峰熊蜂不同日龄的相对表达量。采用邓肯氏新复极差检验法(DMRT 法)比较各日龄相对表达量的差异。

2　结果

2.1　小峰熊蜂 PLA2 基因的克隆及序列分析

根据 RACE 克隆测序结果拼接序列，获得的 PLA2 的 cDNA 全长为 817 bp(图 1)，其 GenBank 登录号为 JF751030.1，包含一个 543 bp 开放阅读框(open reading frame, ORF)，5′和3′末端的非编码区分别为 136 bp 和 138 bp。其 ORF 编码 1 个由 180 个氨基酸组成的多肽，起始密码子为 ATG 和终止密码子为 TAA，并含有 1 个多腺苷酸信号 AATAAA(第 763 ~ 768 位核苷酸)和 1 个 poly(A)尾，ExPASy 软件预测分子量约为 20.78 kD，理论等电点为 6.22。

染色体步移获得 PLA2 基因序列的全长为 2 272 bp，与所获得 cDNA 序列对比分析，结果表明，该基因包含 3 个内含子和 4 个外显子(图 2)。3 个内含子起点位置分别为 146，674 和 1 723 bp，长度分别为 367，889 和 470 bp。

2.2　小峰熊蜂 PLA2 氨基酸序列分析

采用 SignalP 4.1 软件对小峰熊蜂 PLA2 氨基酸序列进行信号肽预测，结果表明，该蛋白包括 1 个 22 个氨基酸残基的信号序列、1 个 22 个氨基酸残基的前肽和 1 个 136 个氨基酸残基的成熟肽。小峰熊蜂 PLA2 包含 10 个半胱氨酸残基、1 个 Ca^{2+} 结合位点和酶活性中心。小峰熊蜂 PLA2 的成熟蛋白序列与其他近缘种 PLA2 序列进行多重序列比对，结果显示在近缘种间氨基酸序列比较保守(图 3)。以丽蝇金小峰 *N. vitripennisi* 为外群对部分蜜蜂科(Apidae) PLA2 氨基酸序列系统进化树分析，结果表明熊蜂属和蜜蜂属的 PLA2 形成 2 个独立分支(图 4)，蜜蜂属分化较早。小峰熊蜂 PLA2 基因和其他种熊蜂 PLA2 基因亲缘关系近，其中与地熊蜂和红光熊蜂的亲缘关系最近，而与 *B. pennsylvanicus* 关系较远，与小峰熊蜂、地熊蜂和红光熊蜂属同一亚属的事实相符。

```
1   catggggcttgtaccctgagcaccatcggaagaaatcgctcttcgtcgagcgttcgatc
61  gtcgcccgagccgatttagacctgcaccttctcgatcttttcgattctttttgctcctg
121 ctgttccacgtgtaccatgcggactctggagttgtgcgttttcactttctggctttgcct
1                   M  R  T  L  E  L  C  V  F  T  F  W  L  C  L
181 gcacgtctctgtccacgcatttcagcatattccgtacagagacgcctatccatttgccga
16    H  V  S  V  H  A  F  Q  H  I  P  Y  R  D  A  Y  P  F  A  D
241 cagtgatatggtagaagtatcggacaggataatattcccaggaacattatggtgcggaaa
36    S  D  M  V  E  V  S  D  R  I  I  F  P  G  T  L  W  C  G  N
301 cggtaacatagcaaatggaacgaaccaattagggtcatggaaggaaacggacgcatgttg
56    G  N  I  A  N  G  T  N  Q  L  G  S  W  K  E  T  D  A  C  C
361 ccgaactcacgatatgtgtcccgacctaatcgaggctcacggctctaaacacggactaac
76    R  T  H  D  M  C  P  D  L  I  E  A  H  G  S  K  H  G  L  T
421 taattccgctgattataccaggttaagctgcgagtgtgacgaggagttccgccattgtct
96    N  S  A  D  Y  T  R  L  S  C  E  C  D  E  E  F  R  H  C  L
481 tcacaattcgggggacaccgttagtgccgggcttgtaggaagaacttatttcaccatgtt
116   H  N  S  G  D  T  V  S  A  G  L  V  G  R  T  Y  F  T  M  L
541 aagaacgcaatgcttccgattggattatcctatcgtgaaatgcaaagtcaaatccaccat
136   R  T  Q  C  F  R  L  D  Y  P  I  V  K  C  K  V  K  S  T  I
601 cttaagacgttgcaaggagtacgagttcgatacaactgccccgaagaagtaccagtggtt
156   L  R  R  C  K  E  Y  E  F  D  T  T  A  P  K  K  Y  Q  W  F
661 cgacgtacttcagtactaaggaaaatgcaacagacctaaaatattatattgtaacgatat
176   D  V  L  Q  Y  -
721 tttacataaacttgtaataaagttgcagattggccgcataaaaataaatatcccacccta
781 tcaaactaacgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图 1　小峰熊蜂 PLA2 基因 cDNA 序列及所推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced amino acid sequences of PLA2 of *Bombus hypocrita*

起始密码子 atg、终止密码子 taa、多聚腺苷酸信号 aataaa 都以下划线显示。The initiation codon atg, translation stop codon taa and the potential polyenylation signal sequence aataaa are all labeled by single underline.

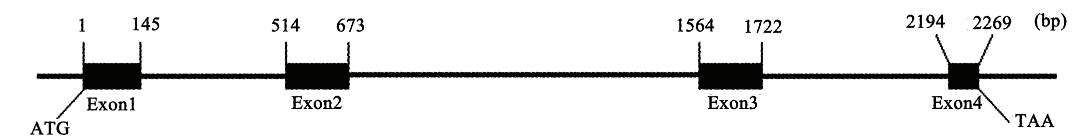


图 2　小峰熊蜂 PLA2 的基因结构

Fig. 2　Genomic structure of PLA2 gene of *Bombus hypocrita*

数字表示在基因组序列中的位置。Numbers indicate the position in the genomic sequences.

2.3　PLA2 基因在熊蜂各组织的表达量分析

采用半定量 PCR 方法检测 PLA2 基因在小峰熊蜂 12 个不同组织器官中的表达水平，结果表明 PLA2 基因在脂肪体、肌肉、神经、气管、复眼、脑中未表达，在足、触角、食道腺中小量表达，在卵巢、中肠、毒腺中条带较亮（图 5），说明在这 3 个组织中表达量可能较高，有待进一步验证。

2.4　PLA2 基因在熊蜂各时期的表达量分析

采用 qRT-PCR 的方法检测小峰熊蜂工蜂 6 个不同发育龄期毒腺中 PLA2 基因的相对表达量。结果表明，PLA2 基因在小峰熊蜂不同日龄均有表达，且各日龄的表达量间差异显著（$P < 0.05$）（图 6）。其中，PLA2 基因在小峰熊蜂 10 日龄时表达量最高，其他日龄表达量从高到低依次是 15，0，5，25 和 20 日龄，整体呈现先上升后下降的趋势。

3　讨论

本研究克隆了小峰熊蜂蜂毒 PLA2 基因，全长为 2 272 bp，基因结构中含有 4 个外显子和 3 个内含子，与前人关于红光熊蜂、意大利蜜蜂和中华蜜蜂的 PLA2 基因研究一致（Li *et al.*, 2005；Valdez-Cruz *et al.*, 2007；Xin *et al.*, 2009），表明熊蜂 PLA2 基因在结构上与蜜蜂相似。Xin 等（2009）报道的红光熊蜂第 3 个外显子和第 4 个外显子的位置分别是第 1 566 ~ 1 724 和 2 196 ~ 2 274 位核苷酸，而本研究中小峰熊蜂其位置分别是第 1 564 ~ 1 722 位核苷酸和 2 194 ~ 2 269 位核苷酸；另外，意大利蜜蜂和中华蜜蜂 PLA2 基因共编码 134 个氨基酸残基（Kuchler *et al.*, 1989；沈立荣等，2002），而小峰熊蜂 PLA2 基因编码 180 个氨基酸残基，这可能是由于不同蜂种的差异性造成的。

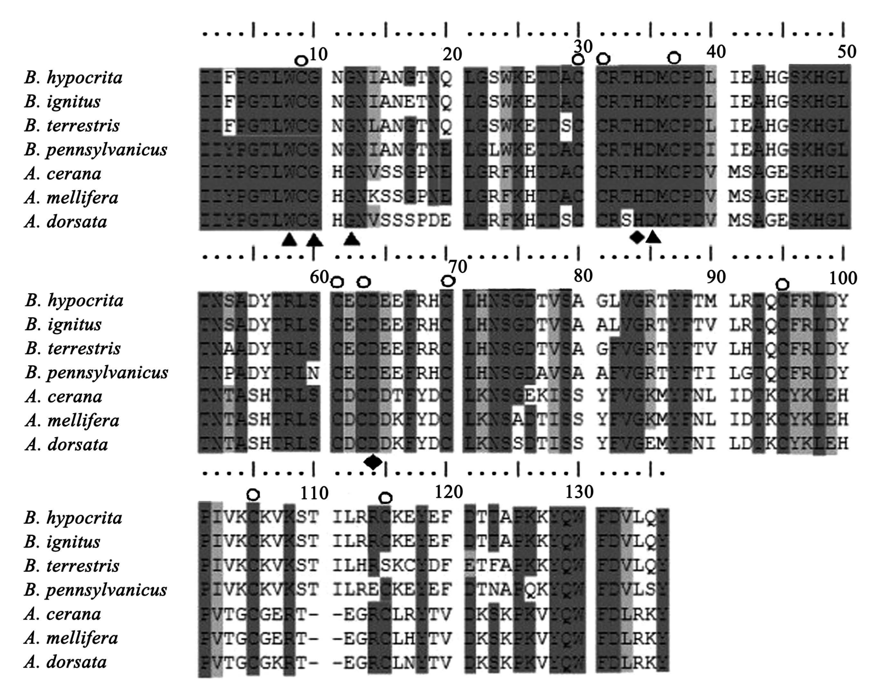


图 3 不同蜂种 PLA2 的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of the known PLA2s from bee species

PLA2 序列来源及 GenBank 登录号 The origin of PLA2s and their GenBank accession numbers: *B. hypocrita*: 小峰熊蜂 *Bombus hypocrita*, AEO51763; *B. ignitus*: 红光熊蜂 *Bombus ignitus*, FJ768907; *B. terrestris*: 地熊蜂 *Bombus terrestris*, P82971; *B. pennsylvanicus*: Q7M4I6; *A. mellifera*: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001011614; *A. cerana*: 东方蜜蜂 *Apis cerana*, A59055; *A. dorsata*: 大蜜蜂 *Apis dorsata*, Q7M415. 相同的残基显示在阴影框里; 横线表示与其他序列保持一致产生的缺口; 10 个半胱氨酸残基用圆圈标注; Ca^{2+} 结合位点(实心三角形)和活性位点(实心菱形号)残基在序列的下方标注。Identical residues are shown in solid boxes. Dashes represent gaps introduced to preserve alignment. The ten cysteines are indicated by open circles. The residues including of the Ca^{2+}-binding site (solid triangle) and the active site (solid diamonds) are indicated below sequences.

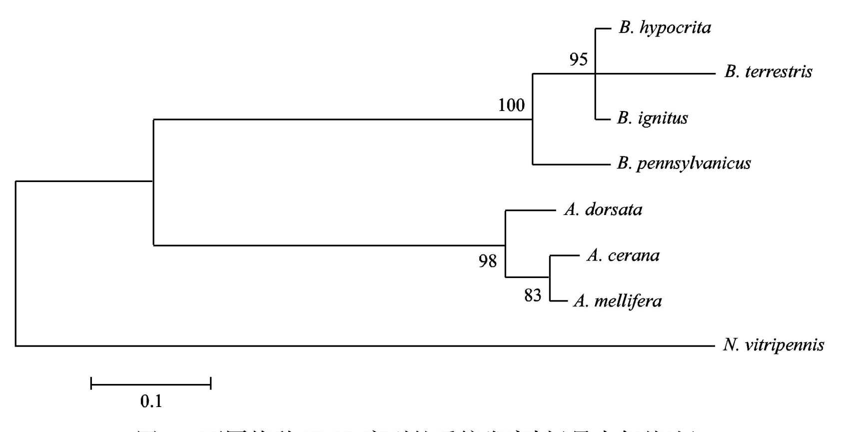


图 4 不同蜂种 PLA2 序列的系统发育树(最大似然法)

Fig. 4 Phylogenetic tree of PLA2 sequences from different bee species (maximum likelihood estimation)

PLA2 序列来源及 GenBank 登录号 The origin of PLA2s and their GenBank accession numbers: *B. hypocrita*: 小峰熊蜂 *Bombus hypocrita*, AEO51763; *B. ignitus*: 红光熊蜂 *Bombus ignitus*, FJ768907; *B. terrestris*: 地熊蜂 *Bombus terrestris*, P82971; *B. pennsylvanicus*: Q7M4I6; *A. mellifera*: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001011614; *A. cerana*: 东方蜜蜂 *Apis cerana*, A59055; *A. dorsata*: 大蜜蜂 *Apis dorsata*, Q7M415; *N. vitripennisi*: 丽蝇金小蜂 *Nasonia vitripennis*, XP_001604598. 分支上的数字代表 1 000 个复制 bootstrap 值; 外群是 *N. vitripennisi* PLA2。The numbers on the branches represent bootstrap values for 1 000 replicates. The outgroup is *N. vitripennisi* PLA2.

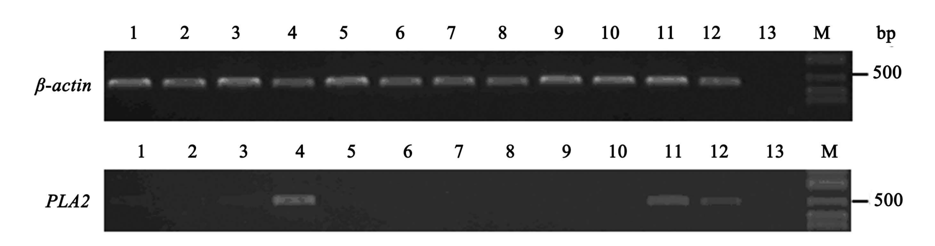


图 5　小峰熊蜂 PLA2 基因在不同组织中的表达水平

Fig. 5　The expression level of PLA2 gene in different tissues of *Bombus hypocrita* adults

1：足 Legs；2：触角 Antennae；3：食道腺 Esophageal glands；4：卵巢 Ovary；5：脂肪体 Fat body；6：肌肉 Muscles；7：神经 Nerve；8：气管 Tracheae；9：复眼 Compound eyes；10：脑 Brain；11：中肠 Midgut；12：毒腺 Venom gland；13：未加模板的阴性对照 Negative control without template；M：DNA marker

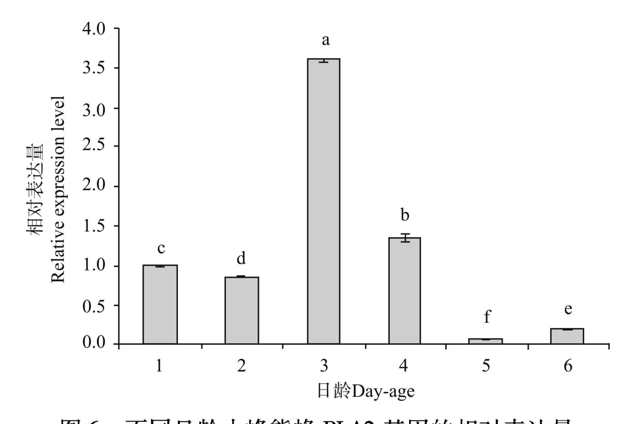


图 6　不同日龄小峰熊蜂 PLA2 基因的相对表达量

Fig. 6　Relative expression level of PLA2 gene in different day-old adults of *Bombus hypocrita*

图中数值为平均值 ± *SE*；柱上不同小写字母表示不同日龄的基因表达量存在显著差异（$P<0.05$）（邓肯氏新复极差检验）。Data in the figure are represented as mean ± *SE*, and different lowercase letters above bars indicate significant difference between different ages in the expression level of PLA2 gene at the 0.05 level (Duncan's multiple range test).

为了明确 PLA2 基因在小峰熊蜂不同组织中的表达特异性，我们以足、触角、食道腺、卵巢、脂肪体、肌肉、神经、气管、复眼、脑、中肠、毒腺为材料进行了半定量 PCR 分析。发现 PLA2 基因在毒腺、卵巢、中肠中表达量较高，说明 PLA2 基因具有组织器官表达特异性，在卵巢及中肠中表达量是否较高有待进一步验证。Xin 等（2009）以红光熊蜂工蜂的脂肪体、中肠、肌肉和毒腺的 mRNA 为材料进行了分析，发现红光熊蜂 PLA2 基因在毒腺中表达，在脂肪体、中肠、肌肉中未表达。由此可见，两个研究中 PLA2 基因均在毒腺中表达，但本研究中 PLA2 基因在小峰熊蜂中肠中表达，而在红光熊蜂中肠未表达。产生差异的原因可能是方法的灵敏度，Xin 等（2009）采用的方法为 RNA 印记（Northern blot）和蛋白质印迹（Western blot），而本研究采用的为半定量 PCR 方法。

本文运用 qRT-PCR 研究了 PLA2 基因在小峰熊蜂不同日龄的表达特征，结果显示 PLA2 基因表达整体趋势为先上升后下降，10 日龄时出现峰值。其中 5 日龄表达量低于 0 日龄，20 日龄表达量低于 25 日龄，该差别是否为取样误差造成有待进一步考究。PLA2 基因的表达量趋势反映了其功能适应性。PLA2 是蜂毒的主要成分之一，也是主要过敏原，主要行使防御功能，其在熊蜂体内的表达水平与生物学特性密切相关。在小峰熊蜂出房初期，主要参与巢内工作，如帮助蜂王泌蜡、筑巢和哺育幼虫等，故其表达量相对较低，待其发育完全，主要工作转向采集食物和守卫（安建东等，2006），故其表达量相对较高。熊蜂生命后期，主要任务又转向巢内工作，且其毒腺逐渐退化，故 PLA2 表达量逐渐降低。意大利蜜蜂工蜂羽化后 14 d 内其蜂毒量持续上升，14 d 时最高。意大利蜜蜂工蜂毒囊内储存毒液的多少与巢内饲料、个体日龄、采集毒液的季节和频率以及品种有很大的关系（余林生，1995），该报道与本文的研究结果基本一致，只是意大利蜜蜂表达量最高峰出现稍滞后了一些。

本研究探明了小熊熊蜂 PLA2 的基因结构及其表达特性，丰富了蜜蜂 PLA2 的生物学基础，为进一步深入研究蜜蜂 PLA2 生物学功能和作用机制、以及开发蜂毒生物制剂等鉴定了基础。

致谢　中国农业科学院蜜蜂研究所安建东博士审阅论文并提出修改建议，在此表示感谢。

参考文献（References）

An JD, Huang JX, Williams PH, Wu J, Zhou BF, 2010. Species diversity and colony characteristics of bumblebees in the Hebei

region of North China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21(6): 1542－1550. [安建东, 黄家兴, Williams PH, 吴杰, 周冰峰, 2010. 河北地区熊蜂物种多样性与蜂群繁育特性. 应用生态学报, 21(6): 1542－1550]

An JD, Peng WJ, Wu J, Guo ZB, Tong YM, Li JL, 2006. Bionomics of *Bombus lucorum* and its application as pollinators. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(1): 94－97. [安建东, 彭文君, 吴杰, 国占宝, 童越敏, 李继莲, 2006. 明亮熊蜂的生物学特性及其授粉应用. 昆虫知识, 43(1): 94－97]

An JD, Williams PH, Zhou BF, Miao ZY, Qi WZ, 2011. The bumblebees of Gansu, Northwest China (Hymenoptera, Apidae). *Zootaxa*, 2865: 1－36.

An JD, Yao J, Huang JX, Shao YQ, Wu J, Li JL, Shi HY, 2008. *Bombus* fauna (Hymenoptera, Apidae) in Shanxi, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 33(1): 80－88. [安建东, 姚建, 黄家兴, 邵有全, 吴杰, 李继莲, 施海燕, 2008. 山西省熊蜂属区系调查(膜翅目, 蜜蜂科). 动物分类学报, 33(1): 80－88]

Argiolas A, Pisano JJ, 1985. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(3): 1437－1444.

Banks BEC, Brown C, Burgess GM, Burnstock G, Claret M, Cocks TM, Jenkinson DH, 1979. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, 282(5737): 415－417.

Buku A, Price JA, 2001. Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release. *Peptides*, 22(12): 1987－1991.

Chen WF, An JD, Dong J, Ding KF, Gao S, 2011. Flower-visiting behavior and pollination ecology of different bee species on greenhouse strawberry. *Chinese Journal of Ecology*, 30(2): 290－296. [陈文锋, 安建东, 董捷, 丁克法, 高山, 2011. 不同蜂在温室草莓园的访花行为和传粉生态学比较. 生态学杂志, 30(2): 290－296]

Dong J, An JD, Huang JX, Zhou ZY, Zhao YZ, Xing YH, 2011. Effects of pollination by different bees on peach fruit development and quality under greenhouse conditions. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 19(4): 836－842. [董捷, 安建东, 黄家兴, 周志勇, 赵亚周, 邢艳红, 2011. 不同蜂传粉对设施桃果实生长发育和品质的影响. 中国生态农业学报, 19(4): 836－842]

Dudler T, Chen WQ, Wang SS, Schneider T, Annand RR, Dempcy RO, Crameri R, Gmachl M, Suter M, Gelb MH, 1992. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1165(2): 201－210.

Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheneval O, Stöcklin M, Bulet P, Stöcklin R, 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47(6): 676－687.

Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA, 1976. The peptide components of bee venom. *European Journal of Biochemistry*, 61(2): 369－376.

Habermann E, 1972. Bee and wasp venoms. *Science*, 177(4046): 314－322.

Hoffman DR, El-Choufani SE, Smith MM, de Groot H, 2001. Occupational allergy to bumblebees: allergens of *Bombus terrestris*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(5): 855－860.

Hoffman DR, Jacobson RS, 1996. Allergens in Hymenoptera venom XXVII: bumblebee venom allergy and allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(3): 812－821.

Kelley MJ, Crowl RM, Dennis EA, 1992. Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1118(2): 107－115.

Kreil G, 1995. Hyaluronidases－a group of neglected enzymes. *Protein Science*, 4(9): 1666－1669.

Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G, 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 184(1): 249－254.

Li JH, Zhang CX, Shen LR, Tang ZH, Cheng JA, 2005. Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60(1): 1－12.

Li JL, Huang JX, Cai WZ, Zhao ZW, Peng WJ, Wu J, 2010. The vitellogenin of the bumblebee, *Bombus hypocrita*: studies on structural analysis of the cDNA and expression of the mRNA. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(2): 161－170.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402－408.

Neumann W, Habermann E, 1954. Über die Phospholipase A des Biennngiftes. *Biological Chemistry*, 296(1): 166－169.

Ribeiro SP, Mendes MA, Santos LD, Souza BM, Marques MR, Azevedo WF, Palma MS, 2004. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, 25(12): 2069－2078.

Ross DC, Crim JW, Brown MR, Herzog GA, Lea AO, 1987. Toxic and antifeeding actions of melittin in the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie): comparisons to bee venom and the insecticides chlorpyriphos and cyromazine. *Toxicon*, 25(3): 307－313.

Scott DL, Otwinowski Z, Geib MH, Sigler PB, 1990. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science*, 250(4987): 1563－1566.

Shen LR, Zhang CX, Cheng JA, 2002. Cloning and sequencing of genes encoding phospholipase A2 from the venom of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 10(1): 29－32. [沈立荣, 张传溪, 程家安, 2002. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A2 基因的克隆与序列分析. 农业生物技术学报, 10(1): 29－32]

Six DA, Dennis EA, 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488(1): 1－19.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT, 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115(2): 246－270.

Valdez-Cruz NA, Segovia L, Corona M, Possani LD, 2007. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Gene*, 396(1): 149－158.

Xin Y, Choo YM, Hu Z, Lee KS, Yoon HJ, Cui Z, Sohn HD, Jin BR, 2009. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A2 from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 154(2): 195－202.

Yoon SY, Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Seo HS, Han HJ, Lee HJ, Beitz AJ, Lee JH, 2008. Bee venom injection produces a peripheral anti-inflammatory effect by activation of a nitric oxide-dependent spinocoeruleus pathway. *Neuroscience Letters*, 430(2): 163－168.

Yu LS, 1995. The domestic and foreign research and use of bee venom. *Apicultural Science and Technology*, (5): 24－26. [余林生, 1995. 国内外蜂毒的研究及其利用. 养蜂科技, (5): 24－26]

Zhao YZ, An JD, Zhou ZY, Dong J, Xing YH, Qin JJ, 2011. Pollination behavior of *Apis mellifera ligustica* and *Bombus hypocrita* (Hymenoptera, Apidae) and the influencing factors in peach greenhouse. *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 89－96. [赵亚周, 安建东, 周志勇, 董捷, 邢艳红, 秦建军, 2011. 意大利蜜蜂和小峰熊蜂在温室桃园的传粉行为及其影响因素. 昆虫学报, 54(1): 89－96]

(责任编辑: 赵利辉)